

“PROCESSO DE APLICAÇÃO DA VIOLACEINA COMO ANTIMICOBACTERIANO”

A tuberculose é uma das causas líder de morte em todo o mundo. Aproximadamente 1/3 da população apresenta a tuberculose no estado latente e há uma previsão de 3 milhões de mortes para esse ano (Gbayisomore e col. Curr. Opin. Infect. Dis. 13, 155 (2000)).

Este fato tem mudado o cenário mundial por décadas e têm favorecido o desenvolvimento de cepas resistentes a multi-drogas (multi-droga-resistência - MDR), com fácil disseminação ao redor do mundo, devido ao aumento das migrações trans-nacionais. O tratamento de tuberculose e seu controle requerem estratégias globais envolvendo organizações internacionais como a Organização Mundial da Saúde (WHO), a União Internacional contra a Tuberculose e Doenças do Pulmão (IUATLD) e outros.

Noventa e cinco por cento dos casos e 98% de mortalidade por tuberculose ocorrem nos países em desenvolvimento. A grande proporção dos casos (75%) ocorre em indivíduos na fase economicamente produtiva (15-50 anos) e se encontram com índices alarmantes por deficiência dos tratamentos, falta de adesão do paciente ao tratamento ou falta de fornecimento regular de drogas principalmente em países da África. Os mesmos problemas se aplicam a alguns países da Europa e nos Estados Unidos. Na América Latina, o Peru, a Bolívia e o Haiti são os líderes da alta incidência de tuberculose seguidos pela Argentina, El Salvador, Honduras, México e Brasil (World Health Organization. Global Tuberculosis Control. Geneva, 2000).

Neste novo milênio muitos e importantes passos precisam ser tomados com relação ao tratamento da tuberculose e controle da propagação. Isto tem levado à contínua pesquisa por uma quimioterapia alternativa por meio da identificação de novas drogas que sejam mais eficazes e menos tóxicas que as correntemente em uso.

A *Chromobacterium violaceum* produz vários compostos que apresentam atividades biológicas. Dentre eles estão os potenciadores de antibióticos beta-lactâmicos glicopeptídeos, o SQ28,504 e SQ28,546 (Cooper e col. US Patent US4752469-A (1984)), antibióticos como o aerocianidin e aerocavin (Liu, US Patent

US4686299-A (1987)), o 3,6-diidroxiindoxazene (também chamado Y-TO678H, ou 6-hidroxi-3-oxo-1,2-benzisoxazole) (Yamanouchi, JP Patent JP58072519-A (1983)), monobactama SB-26.180 (Cimarusti e col. US Patent US4386034-A (1983)), um antitumoral depsipeptídeo, FR901228 que é um agente seletivo contra leucemia crônica das células linfocíticas em ensaios clínicos (Fujita e col. US Patent US4977138-A (1990)), o antibiótico antitumoral WB968 (Higaki e col. JP Patent JP 090311088-A2 (1997)), e o inibidor de carboxipeptidase o arfamenine B (Zii Biseibutsu, JP Patent JP59144717-A (1984)). Além destes compostos, há a violaceína, um pigmento violeta, também extraído desta bactéria. A violaceína destaca-se por sua ampla atividade antibiótica (Durán e col. PIBr 9801307 (1998); Rettori e col. PIBr 9702986-6 (1997)) e antitumoral (Durán e col. PIBr 9702918 (1997)), tripanossomicida *in vitro* (Haun e col. Biol.res.25, 21 (1992)).

Dentro deste contexto, é importante contar com novas drogas antimicobacterianas de estruturas diferentes das já utilizadas na quimioterapia contra a tuberculose.

O sistema apresentado neste processo foi desenvolvido utilizando-se a violaceína obtida da *C. violaceum* e purificada de acordo com metodologia descrita (Rettori e col. PIBr PIBr 9702986-6 (1997)). A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada através da técnica da macrodiluição em meio líquido. A diluição inicial da violaceína foi preparada em dimetilsulfóxido (1 mg/mL) e as diluições subsequentes foram efetuadas em meio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido com ADC (albumina-dextrose-catalase) Difco) nas concentrações 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 µg/mL (diluições aquosas). O dimetilsulfóxido foi usado nos controles na mesma proporção usada para a violaceína e não apresentou nenhum efeito tóxico sobre as micobactérias. As cepas de micobactérias (*M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294, *M. tuberculosis* H₃₇Ra ATCC 25177, *M. avium* ATCC 15769, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. intracellulare* ATCC 25169, *M. malmoense* ATCC 29571) foram cultivadas em meio Lowenstein-jensen à 37°C por três semanas e subcultivada em meio líquido de Middlebrook 7H9 enriquecido com ADC (Difco) à 37°C por 10 dias, quando a densidade microbacteriana atingiu uma turbidez correspondente a escala padrão N^o1 de McFarland (1x10⁷ micobactérias/mL).

Aos tubos contendo as diferentes diluições da droga e aos tubos controles foram adicionados 50 µL das suspensões de micobactérias. Os tubos foram incubados a 37°C por 10 dias, quando se realizou a leitura macroscópica do crescimento micobacteriano, por turvação do meio de cultura. A CIM foi determinada como a menor concentração da droga capaz de inibir macroscopicamente o crescimento micobacteriano. Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizado o subcultivo em meio de cultura sólido das diluições iguais ou superior às CIM determinadas pela técnica da macrodiluição. Para isso 100 µL dessas diferentes diluições foram inoculados em meio de Lowenstein-Jensen e os inóculos incubados à 37°C por 30 dias, para posterior leitura. A CBM foi definida como a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento da população micobacteriana no meio de cultura.

As formulações da violaceína apresentaram uma concentração inibitória mínima (CIM) abaixo de 64,0 µg/mL e concentração bactericida mínima (CBM) abaixo de 128 µg/mL quando testada frente às cepas padrões de micobactérias. Estes valores de CIM e CBM representam a mesma faixa de atividade apresentada pela pirazinamida, um dos quimioterápicos usados no tratamento de tuberculose. A pirazinamida em diferentes cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 27294, ATCC 35801 e ATCC 35828) mostrou valores de CIM variando de 16 a > 2048 µg/mL.

REIVINDICAÇÕES

1. **“PROCESSO DE APLICAÇÃO DA VIOLACEINA COMO ANTIMICOBACTERIANO”**, caracterizado por desenvolver e descrever uma aplicação da violaceína como antimicobacteriano, dissolvendo o composto em dimetilsulfóxido e preparando soluções aquosas (diluções em meio de Middlebrook 7H9 enriquecido com albumina-dextrose-catalase).

2. **“PROCESSO DE APLICAÇÃO DA VIOLACEINA COMO ANTIMICOBACTERIANO”**, caracterizado por demonstrar que a violaceína livre em solução aquosa (diluída em meio de cultura Middlebrook 7H9 enriquecido com albumina-dextrose-catalase) mostra frente a diversas cepas de micobactérias valores de Concentração inibitória mínima (CIM) abaixo de 64 µg/mL, similares aos da pirazinamida, quimioterápico usado para tratamenro da tuberculose.

3. **“PROCESSO DE APLICAÇÃO DA VIOLACEINA COMO ANTIMICOBACTERIANO”**, caracterizado por demonstrar que a violaceína livre em solução aquosa (diluída em meio de cultura Middlebrook 7H9 enriquecido com albumina-dextrose-catalase) mostra valores de Concentração Bactericida Mínima (CBM) abaixo de 128 µg/mL frente a diversas cepas padrões de micobactérias.

RESUMO

“PROCESSO DE APLICAÇÃO DA VIOLACEÍNA COMO ANTIMICOBACTERIANO”

Este processo descreve a aplicação de violaceína formulada para atividade antimicobacteriana.

5 Neste processo, a violaceína foi dissolvida em dimetilsulfóxido, para seu posterior utilizada em soluções aquosas (diluições em meio de Middlebrook 7H9 enriquecido com albumina-dextrose-catalase) mostrando frente a diversas cepas de micobactérias valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) abaixo de 64 µg/mL e de Concentração Bactericida Mínima (CBM) abaixo de 128 µg/mL, valores
10 similares aos da pirazinamida, quimioterápico usado para tratamento da tuberculose.